



⑮ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 199 57 418 A 1**

⑨ Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**G 02 B 21/00**  
G 02 F 1/11  
G 02 F 1/33

⑲ Aktenzeichen: 199 57 418.9  
⑳ Anmeldetag: 29. 11. 1999  
㉑ Offenlegungstag: 31. 5. 2001

**DE 199 57 418 A 1**

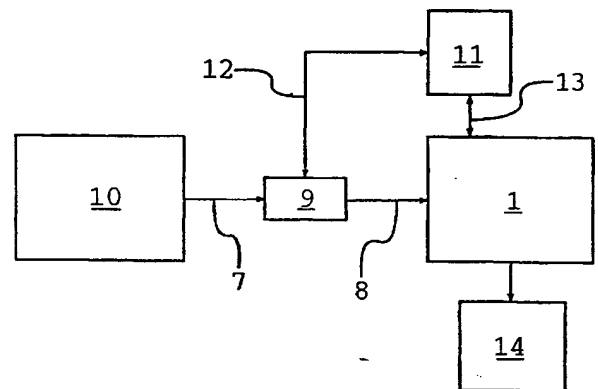
⑦① Anmelder:  
Leica Microsystems Heidelberg GmbH, 69120  
Heidelberg, DE

⑦④ Vertreter:  
Ullrich & Naumann, 69115 Heidelberg

⑦② Erfinder:  
Knebel, Werner, Dr., 76709 Kronau, DE; Bradl,  
Joachim, Dr., 69198 Schriesheim, DE

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

- ⑤④ Verfahren zur lichtoptischen Abtastung eines Objekts und Rastermikroskop zur Anwendung des Verfahrens
- ⑤⑦ Ein Verfahren und ein Rastermikroskop (1) zur Anwendung des Verfahrens zur lichtoptischen Abtastung eines Objekts, vorzugsweise bei der Rastermikroskopie, insbesondere bei der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie, wobei die Intensität des Lichts geregelt wird, ist zur Optimierung der Signalausbeute schon während der eigentlichen Datenaufnahme bzw. Messung dadurch gekennzeichnet, dass die Regelung in Abhängigkeit von der jeweiligen Fokusposition (2) im Objektbereich (3) des gesteuerten, fokussierten Lichtstrahls erfolgt.



**DE 199 57 418 A 1**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur lichtoptischen Abtastung eines Objekts, vorzugsweise bei der Rastermikroskopie, insbesondere bei der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie, wobei die Intensität des Lichts geregelt wird. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Rastermikroskop zur Anwendung des Verfahrens zur Intensitätsregelung des Lichts.

Verfahren der gattungsbildenden Art werden in einer Vielzahl von Bereichen eingesetzt, die Intensitätsregelung des Lichts dient hierbei in erster Linie der Bereitstellung einer Lichtquelle mit einer von der Zeit unabhängigen konstanten Lichtintensität. Einen konstante Lichtintensität ist hierbei eine Voraussetzung für quantitative Untersuchungen.

Beim Vorliegen eines geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses, insbesondere bei der konfokalen Fluoreszenz-Laserscanning-Mikroskopie, kommt das sogenannte "Auto-Gain"-Verfahren zum Einsatz. Lediglich beispielhaft wird auf die US 4 412 246 hingewiesen, bei der für sich gesehen ein Verfahren zur Anpassung eines Polarisations- oder Interferenz-Video-Mikroskopsystems unter Verwendung eines Auto-Gain-Verfahrens beschrieben ist. Beim Auto-Gain-Verfahren wird während der Datenaufnahme bzw. während der lichtoptischen Abtastung eines Objekts die Verstärkung der Detektoren, beispielsweise von Photomultipliern, dem tatsächlich vorliegenden Dynamikbereich der Meßsignale angepaßt, so dass dann bei konstanter Beleuchtungsintensität eine nahezu ideale Bildinformation vorliegt.

Weiterhin ist eine nachträgliche rechnergesteuerte Rekonstruktion der gemessenen Daten möglich, die dem Auto-Gain-Verfahren nachempfunden ist.

Das Auto-Gain-Verfahren und die rechnergesteuerte Rekonstruktion liefern lediglich visuell der Eindruck eines besseren Bildes. Der Informationsgehalt der Messung bzw. das der Messung zugrundeliegende Signal-zu-Rausch-Verhältnis wird hierdurch nicht verbessert, da das Meßsignal selbst nicht beeinflusst wird. Insbesondere wird auch das Rauschen verstärkt, bei einem zu geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Messung können Artefakte vorgetäuscht werden oder das Meßergebnis gänzlich unbrauchbar sein.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren der gattungsbildenden Art auszugestalten und weiterzubilden, dass die Signalausbeute schon während der eigentlichen Datenaufnahme bzw. Messung optimiert wird. Des weiteren liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Rastermikroskop zur Optimierung der Signalausbeute schon während der eigentlichen Datenaufnahme bzw. Messung anzugeben.

Die voranstehende Aufgabe wird durch die Merkmale des Patentanspruchs 1 gelöst. Danach ist ein Verfahren zur lichtoptischen Abtastung eines Objekts, dadurch gekennzeichnet, dass die Regelung in Abhängigkeit von der jeweiligen Fokusposition im Objektbereich des gerasterten, fokussierten Lichtstrahls erfolgt.

Erfindungsgemäß ist zunächst erkannt worden, dass eine Verbesserung der Signalausbeute bei lichtoptischen Abtastverfahren durch eine Anpassung bzw. Regelung der Intensität des verwendeten Lichts erzielt werden kann. Wenn die Anpassung bzw. Regelung dann auch in Abhängigkeit von dem jeweiligen Abtastort bzw. der jeweiligen Fokusposition erfolgt, kann die Signalausbeute sogar optimiert werden. Diese erfindungsgemäße Vorgehensweise ist insbesondere dann von großem Vorteil, wenn das gemessene Signal der lichtoptischen Abtastung ein zu geringes Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufweist. Durch die Regelung der Lichtintensität wird das abzutastende Objekt mit mehr oder weniger Licht

beaufschlagt, dass zu detektierende Streu-, Reflektions- oder Fluoreszenzlicht kann somit zumindest in einem gewissen Bereich in seiner Intensität entsprechend erhöht bzw. verringert werden. Über die Lichtintensitätsregelung kann letztendlich eine Anpassung bzw. Regelung des Detektionslichts an den Dynamikbereich des verwendeten Detektors erzielt werden.

Im Konkreten könnte die Regelung der Intensität des Lichts in Abhängigkeit von der jeweiligen axialen Fokusposition erfolgen. Dies ist insbesondere dann von Vorteil, wenn ein zumindest teildurchlässiges, dreidimensionales Objekt optisch abgetastet wird und wenn in Abhängigkeit der axialen Fokusposition des Abtaststrahls in dem dreidimensionalen Objekt eine zumindest teilweise Absorption des Beleuchtungslichts auftritt. Dementsprechend wäre die Lichtintensität zu erhöhen, je tiefer der Lichtstrahl in das Objekt eindringt, also je tiefer die jeweilige Fokusposition ist.

Ebenfalls wäre eine Regelung der Intensität des Lichts in Abhängigkeit von der jeweiligen lateralen Fokusposition denkbar. Dies ist insbesondere dann von Vorteil, wenn einzelne Objektbereiche das Beleuchtungslicht stärker absorbieren als die übrigen Objektbereiche. In diesem Fall könnte eine Erhöhung der Lichtintensität gerade dann erfolgen, wenn der abzutastende lichtoptische Strahl sich an einer solchen stark absorbierenden lateralen Abtastposition befindet.

Die Fokusposition bzw. die Fokuspositionen sind von dem Benutzer vorgebar. Letztendlich legt der Benutzer den Bereich fest, der vom Objekt lichtoptisch abgetastet wird. Die Festlegung des abzutastenden Objektbereichs könnte automatisch oder interaktiv erfolgen, im letzteren Fall könnte der Benutzer den Bereich an der Steuer- bzw. Regelungseinheit des entsprechenden lichtoptischen Abtastgeräts eingeben.

In einer alternativen Ausführungsform erfolgt die Regelung der Intensität gemäß einer analytischen Formel. Die analytische Formel könnte eine Verknüpfung der Ortskoordinate der jeweiligen Fokusposition des Abtaststrahls im Objekt mit dem jeweiligen einzustellenden bzw. zu regelnden Intensitätswert des Lichts sein. Auch könnte die Abtastgeschwindigkeit des lichtoptischen Strahls in die analytische Formel einbezogen werden.

Ist die gesamte Absorption des beobachtenden Objekts vernachlässigbar oder gering, d. h. das Objekt weist eine Absorption von maximal 10% auf, könnte die Regelung der Intensität des Lichts gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz erfolgen. Diese Regelungsvariante ist bevorzugt für eine Lichtintensitätsanpassung zweckdienlich bei der unterschiedlichen axiale Fokuspositionen entsprechender dreidimensionaler Objekte lichtoptisch abgetastet werden, da hierdurch Absorptionsverluste des Beleuchtungslichts im Objekt ausgeglichen werden können.

In einer konkreten Ausführungsform erfolgt die Regelung der Intensität des Lichts mit einem Auto-Gain-Verfahren. Hierbei wird die Lichtintensität an den gemessenen Dynamikbereich der Meßwerte angepaßt.

Weiterhin ist eine Kombination der bislang beschriebenen Regelungsmöglichkeiten denkbar. Beispielsweise könnte die Intensitätsregelung des Lichts bezüglich der jeweiligen axialen Fokusposition gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz erfolgen, bezüglich der jeweiligen lateralen Fokusposition eine analytische Formel zugrundeliegen, sowie insgesamt eine Regelung der Lichtintensität mit einem Auto-Gain-Verfahren erfolgen.

Bei der Regelung der Lichtintensität könnte ebenfalls der Brechungsindex des Einbettungsmediums des Objekts bzw. der Brechungsindex des Objekts selbst berücksichtigt wer-

den. Auch die Berücksichtigung von Brechungsindexübergängen, beispielsweise vom Deckglas zum Objektmedium, ist denkbar.

In einer konkreten Ausführungsform erfolgt die Regelung der Intensität des Lichts in Verbindung mit einem im Steuerrechner des Rastermikroskops implementierten Expertensystem. Dieses Expertensystem berücksichtigt die Eigenschaften des Objekts selbst, die Eigenschaften eines eventuellen Einbettungs- bzw. Objektmediums, die physikalischen Randwerte, die Meßanordnung sowie eine obere Grenze der Lichtintensität, mit der das Objekt maximal beaufschlagt werden darf. Auch diese Intensitätsregelung des Lichts könnte von dem Benutzer interaktiv beeinflusst werden.

In vorteilhafter Weise wird die Information über die Regelung der Intensität des Lichts während einer Datenaufnahme bei einer Datenvisualisierung berücksichtigt. So wird jedem detektierten Bildpunkt neben seinem Intensitätswert und seiner Ortskoordinate der seiner Messung zugrundeliegende Beleuchtungsintensitätswert zugewiesen. Eine Datenvisualisierung könnte entweder simultan oder nach der Datenaufnahme erfolgen. Eine simultane Datenvisualisierung könnte beispielsweise mit dem Steuer- bzw. Regelungsrechner des Rastermikroskops erfolgen. Ganz besonders von Vorteil ist die Berücksichtigung der Information über die Regelung der Intensität des Lichts während einer Datenaufnahme für ein Computer-Restaurationsverfahren bzw. einem digitalen Rekonstruktionsverfahren. Diese Restaurations- bzw. Rekonstruktionsverfahren gehen im Allgemeinen von einer konstanten Beleuchtungsintensität aus, die bei diesem erfindungsgemäßen Verfahren nicht vorliegt. Dementsprechend könnten diese Restaurations- bzw. Rekonstruktionsverfahren bei Berücksichtigung der Informationen über die Regelung der Intensität des Lichts während der Datenaufnahme dennoch angewandt werden.

In einer weiteren Ausführungsform erfolgt die Regelung der Intensität des Lichts mit einem im Strahlengang des Rastermikroskops angeordneten aktiven optischen Element. Dies ist insbesondere deshalb vorteilhaft, da ein solches aktives optisches Element eine schnelle, reproduzierbare und genaue Lichtintensitätsregelung zuläßt. Als aktives optisches Element könnte beispielsweise ein AOM (Acousto-Optical-Modulator) eingesetzt werden. Ebenso ist die Verwendung eines AOTF (Acousto-Optical-Tunable-Filter) oder eines AOD (Acousto-Optical-Deflector) denkbar.

Alternativ hierzu könnte die Regelung der Intensität des Lichts mit einem im Strahlengang des Rastermikroskops angeordneten passiven optischen Element erfolgen. Dieses passive optische Element könnte beispielsweise eine rotierende Graufilterscheibe mit unterschiedlichen azimuthalen Transmissionswerten sein. Die Regelung der Intensität des Lichts könnte auch mit der Lichtquelle selbst bzw. mit der deren Steuereinheit realisiert werden.

Die Ansteuerung des im Strahlengang des Rastermikroskops angeordneten aktiven oder passiven optischen Elements oder der Lichtquelle selbst könnte durch den Steuerrechner des Rastermikroskops erfolgen. Da der Steuerrechner in der Regel die Abtastung des Objekts steuert bzw. regelt, daher die jeweilige laterale bzw. axiale Fokusposition kennt, ist insbesondere eine unmittelbare und schnelle Ansteuerung bzw. Synchronisation der Intensitätsregelung des Lichts mit dem Steuerrechner zweckdienlich und vorteilhaft.

In einer alternativen Ausführungsform wird die Transmissionsdetektionsvorrichtung des Rastermikroskops in Abhängigkeit der jeweiligen Fokusposition im Objektbereich des gerasterten, fokussierten Lichtstrahls derart angepaßt, dass mit der Transmissionsdetektionsvorrichtung eine maximale Signalausbeute detektierbar ist. Diese Anpassung

kann entweder zusätzlich zur Lichtintensitätsregelung oder unabhängig davon durchgeführt werden.

Diese Anpassung könnte in Abhängigkeit der jeweiligen axialen Fokusposition des gerasterten, fokussierten Lichtstrahls erfolgen. Zur Anpassung der Transmissionsdetektionsvorrichtung an die jeweilige axiale Fokusposition könnte das Linsensystem der Transmissionsdetektionsvorrichtung in axialer Richtung positioniert werden. Hierdurch kann letztendlich sichergestellt werden, dass sämtliche Detektionsstrahlen, die von der numerischen Apertur des Linsensystems der Transmissionsdetektionsvorrichtung erfaßt werden, auch auf den Transmissionsdetektor abgebildet und von ihm detektiert werden. Alternativ hierzu könnte auch eine Änderung der Vergrößerung des Linsensystems der Transmissionsdetektionsvorrichtung erfolgen.

Die Anpassung des Transmissionsdetektors der Transmissionsdetektionsvorrichtung in Abhängigkeit von der jeweiligen axialen Fokusposition ist ebenfalls denkbar. Insbesondere könnte die Anpassung durch eine Positionierung des Transmissionsdetektors in axialer Richtung erfolgen. Auch eine Kombination der Anpassung des Linsensystems und des Transmissionsdetektors kann in vorteilhafter Weise die Signalausbeute der Transmissionsdetektionsvorrichtung maximieren.

Des weiteren wird ein Rastermikroskop zur Lösung der eingangs genannten Aufgabe angegeben, bei dem das erfindungsgemäße Verfahren und dessen Weiterbildungen Anwendung finden.

Das erfindungsgemäße Rastermikroskop wird zur Anregung bzw. Detektion von Fluoreszenzobjekten eingesetzt, die mit einem Ein-, Zwei- oder Mehr-Photonen-Anregungsprozeß anregbar sind. Insbesondere bei den Zwei- bzw. Mehr-Photonen-Anregungsprozessen ist es möglich, Objektbereiche abzutasten und zu detektieren, die von dem Übergang Deckglas-Objektmedium weiter entfernt sind, sozusagen tiefer in der Probe lokalisiert sind. Da der Anteil des im Objektbereich gestreuten Anregungslichts mit zunehmenden Abstand von dem Übergang Deckglas-Objektmedium zunimmt, ist eine Zwei- bzw. Mehr-Photonen-Fluoreszenz-Anregung nicht mehr optimal und liefert nur noch ein geringes Fluoreszenzsignal.

Daher ist ein Rastermikroskop zur Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens in der Lage, in Abhängigkeit des Abstands Deckglas-Objektbereich genügend Lichtintensität für einen effizienten Zwei- bzw. Mehr-Photonen-Anregungsprozeß zu Verfügung zu stellen. Aufgrund der Intensitätsabhängigkeit des Zwei- bzw. Mehr-Photonen-Anregungsprozesses ist eine Fluoreszenzanregung nur im Fokallvolumen des Rastermikroskops gegeben. Objektbereiche oberhalb und unterhalb der aktuellen Fokusposition werden hierbei nicht zur Fluoreszenz angeregt. Daher findet auch für die Bereiche außerhalb der Fokusposition kein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs statt.

Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, die Lehre der vorliegenden Erfindung in vorteilhafter Weise auszugestalten und weiterzubilden. Dazu ist einerseits auf die dem Patentanspruch 1 nachgeordneten Patentansprüche, andererseits auf die nachfolgende Erläuterung von Ausführungsbeispielen der Erfindung anhand der Zeichnungen zu verweisen. In Verbindung mit der Erläuterung der bevorzugten Ausführungsbeispiele anhand der Zeichnungen werden auch im allgemeinen bevorzugte Ausgestaltungen und Weiterbildungen der Lehre erläutert. In den Zeichnungen zeigt Fig. 1 in einer schematischen Darstellung ein Blockschaltbild eines ersten Ausführungsbeispiels eines erfindungsgemäßen Rastermikroskops,

Fig. 2 in einer schematischen Darstellung ein XZ-Schnitt des Objektbereichs eines erfindungsgemäßen Rastermikro-

skops.

In Fig. 1 ist ein Blockschaltbild eines Rastermikroskops 1 zur Zwei-Photonen-Anregung von Fluoreszenzobjekten gezeigt.

Erfindungsgemäß kommt bei dem Rastermikroskop 1 das Verfahren zur lichtoptischen Abtastung eines Objekts zum Einsatz. Hierbei wird die Regelung der Intensität des Lichts in Abhängigkeit von der jeweiligen Fokusposition 2 im Objektbereich 3 des gerasterten, fokussierten Lichtstrahls durchgeführt. Die Regelung der Intensität des Licht erfolgt hierbei in Abhängigkeit der jeweiligen axialen Fokusposition in Richtung Z. Der aufzunehmende Objektbereich wird vor der eigentlichen Datenaufnahme vom Benutzer vorgegeben. Hierbei kann sich der Bereich entlang der optischen Achse 4 des Mikroskopobjektivs 5 vom Übergang vom Deckglas 6 zum Objektbereich 3 bis hin zum maximalen Arbeitsabstand des Mikroskopobjektivs 5 erstrecken. Im Allgemeinen wird sich der den Benutzer interessierende Bereich bezüglich der Fokalebene 16 des Mikroskopobjektivs 5 von einem Bereich 14 oberhalb der Fokalebene 16 zu einem Bereich 15 unterhalb der Fokalebene 16 in Z-Richtung erstrecken. Die Regelung der Intensität des Anregungslichts erfolgt hierbei in gemäß einer analytischen Formel und zwar steigt die Lichtintensität linear mit dem Abstand zwischen der axialen Fokuskugel und dem Übergang Deckglas 6 - Objektmedium 3. Bei der Regelung wird ebenfalls der Brechungsindex des Immersionsmediums 19, des Einbettungsmediums bzw. des Objektbereichs 3 berücksichtigt. Falls lediglich eine einzelne Bildebene in XY-Richtung (lateral) aufgenommen wird, erstreckt sich der aufgenommene Bereich in Z-Richtung über den Tiefenschärfenbereich 17 des Mikroskopobjektivs 5.

Der Fig. 1 ist entnehmbar, dass die eigentliche Regelung der Lichtintensität mit einem im Strahlengang 7, 8 des Rastermikroskops 1 angeordneten aktiven optischen Element 9 erfolgt. An das aktive optische Element 9 ist als AOTF (Acousto-Optical-Tunable-Filter) ausgeführt und ist in der Lage, das von dem Laser 10 emittierte Laserlicht 7 hinsichtlich der Intensität zu regeln. Der Regelbereich des aktiven optischen Elements 9 erstreckt sich von 100% bis 0%, d. h. das das AOTF 9 durchlaufene Licht 8 weist entweder die gleiche Intensität wie das vom Laser 10 emittierte Licht 7 auf (100%) oder hat den Intensitätswert 0. Jeder Zwischenwert kann ebenfalls mit dem AOTF 9 eingestellt werden.

Das AOTF 9 wird vom Steuerrechner 11 über eine entsprechende Verbindung 12 angesteuert. Der Steuerrechner 11 steuert bzw. regelt über die Verbindung 13 den Scanvorgang des Rastermikroskops 1. Daher ist die aktuelle Fokusposition 2 des fokussierten, gerasterten Laserstrahls 8 dem Steuerrechner 11 bekannt, der über Leitung 12 das AOTF 9 mit einer hinreichenden Geschwindigkeit ansteuern kann.

In Fig. 1 ist lediglich schematisch die Transmissionsdetektionsvorrichtung 13 des Rastermikroskops 1 gezeigt. Es handelt sich hierbei um einen sogenannten "Non-Scanned-Detector". Hierbei wird das Fluoreszenzlicht nicht von einem Scanspiegel zu einem ortsfesten Lichtstrahl transformiert, der dann über ein Detektionspinhole mit nachgeordnetem Photomultiplier nachgewiesen wird, sondern das Fluoreszenzlicht wird direkt im Transmissions-Modus detektiert. Da der Fluoreszenzlichtstrahl nicht ortsfest ist, wird ein flächenförmiger Detektor ohne Detektionspinhole verwendet.

Im konkreten wird das Detektionssignal der Transmissionsdetektionsvorrichtung 13 dadurch maximiert, dass die jeweilige Position des Transmissionsdetektors der jeweiligen Fokusposition 2 des Anregungslichts 8 angepaßt wird, indem eine Positionierung des Transmissionsdetektors in axialer Richtung erfolgt. Somit wird das Fluoreszenzlicht

der jeweiligen Fokusposition 2 auf den Transmissionsdetektor abgebildet. Hierbei ist die gesamte numerische Apertur des Transmissionslinsensystems ausgenutzt, sie ist durch die äußeren Detektionsstrahlen 18 angedeutet.

Abschließend sei ganz besonders darauf hingewiesen, dass die voranstehend erörterten Ausführungsbeispiele lediglich zur Beschreibung der beanspruchten Lehre dienen, diese jedoch nicht auf die Ausführungsbeispiele einschränken.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur lichtoptischen Abtastung eines Objekts, vorzugsweise bei der Rastermikroskopie, insbesondere bei der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie, wobei die Intensität des Lichts geregelt wird, dadurch gekennzeichnet, dass die Regelung in Abhängigkeit von der jeweiligen Fokusposition (2) im Objektbereich (3) des gerasterten, fokussierten Lichtstrahls erfolgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Regelung der Intensität des Lichts in Abhängigkeit von der jeweiligen axialen Fokusposition erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Regelung der Intensität des Lichts in Abhängigkeit von der jeweiligen lateralen Fokusposition erfolgt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Fokuspositionen in einem Objektbereich liegen, der vom Benutzer vorgegeben wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Regelung der Intensität des Lichts gemäß einer analytischen Formel erfolgt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Regelung der Intensität des Lichts gemäß des Lambert-Beer'schen Gesetzes erfolgt.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Regelung der Intensität des Lichts mit einem Auto-Gain-Verfahren erfolgt.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Regelung der Intensität des Lichts aus einer Kombination der Regelungsmöglichkeiten nach den Ansprüchen 5 bis 7 erfolgt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass zur Regelung der Intensität des Lichts der Brechungsindex des Einbettungsmediums des Objekts berücksichtigt wird.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Regelung der Intensität des Lichts in Verbindung mit einem im Steuerrechner des Rastermikroskops implementierten Expertensystem erfolgt.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Information über die Regelung der Intensität des Lichts während einer Datenaufnahme bei einer Datenvisualisierung berücksichtigt wird.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Information über die Regelung der Intensität des Lichts während einer Datenaufnahme bei einem Computer-Restaurationsverfahren bzw. einem digitalen Rekonstruktionsverfahren berücksichtigt wird.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Regelung der Intensität

des Lichts mit einem im Strahlengang (7, 8) des Rastermikroskops (1) angeordneten aktiven optischen Element (9) erfolgt.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass als aktives optisches Element (9) ein AOM (Acousto-Optical-Modulator) verwendet wird.

15. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass als aktives optisches Element (9) ein AOTF (Acousto-Optical-Tunable-Filter) verwendet wird.

16. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass als aktives optisches Element (9) ein AOD (Acousto-Optical-Deflector) verwendet wird.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Regelung der Intensität des Lichts mit einem im Strahlengang (7, 8) des Rastermikroskops (1) angeordneten passiven optischen Element (9) erfolgt.

18. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass als passives optisches Element (9) eine Graufilterscheibe verwendet wird.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Regelung der Intensität des Lichts an der Lichtquelle (10) erfolgt.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass der Steuerrechner (11) des Rastermikroskops (1) das aktive oder das passive Element (9) oder die Lichtquelle (10) ansteuert.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Transmissionsdetektionsvorrichtung (13) des Rastermikroskops (1) in Abhängigkeit von der jeweiligen Fokusposition (2) im Objektbereich des gerasterten, fokussierten Lichtstrahls derart angepasst wird, dass mit der Transmissionsdetektionsvorrichtung (13) eine maximale Signalausbeute detektierbar ist.

22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass das Linsensystem der Transmissionsdetektionsvorrichtung in Abhängigkeit von der jeweiligen axialen Fokusposition (2) entsprechend angepasst wird.

23. Verfahren nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Anpassung durch eine Positionierung des Linsensystems der Transmissionsdetektionsvorrichtung (13) in axialer Richtung erfolgt.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 21 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass die Anpassung durch eine Änderung der Vergrößerung des Linsensystems der Transmissionsdetektionsvorrichtung (13) erfolgt.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 21 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass der Transmissionsdetektor der Transmissionsdetektionsvorrichtung (13) in Abhängigkeit von der jeweiligen axialen Fokusposition (2) entsprechend angepasst wird.

26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Anpassung durch eine Positionierung des Transmissionsdetektors der Transmissionsdetektionsvorrichtung (13) in axialer Richtung erfolgt.

27. Rastermikroskop zur Anwendung des Verfahrens zur Intensitätsregelung nach einem der Ansprüche 1 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass Fluoreszenzobjekte mit einem Ein-Photonen-Anregungsprozess anregbar sind.

28. Rastermikroskop zur Anwendung des Verfahrens zur Intensitätsregelung nach einem der Ansprüche 1 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass Fluoreszenzobjekte mit einem Zwei-Photonen-Anregungsprozess anregbar sind.

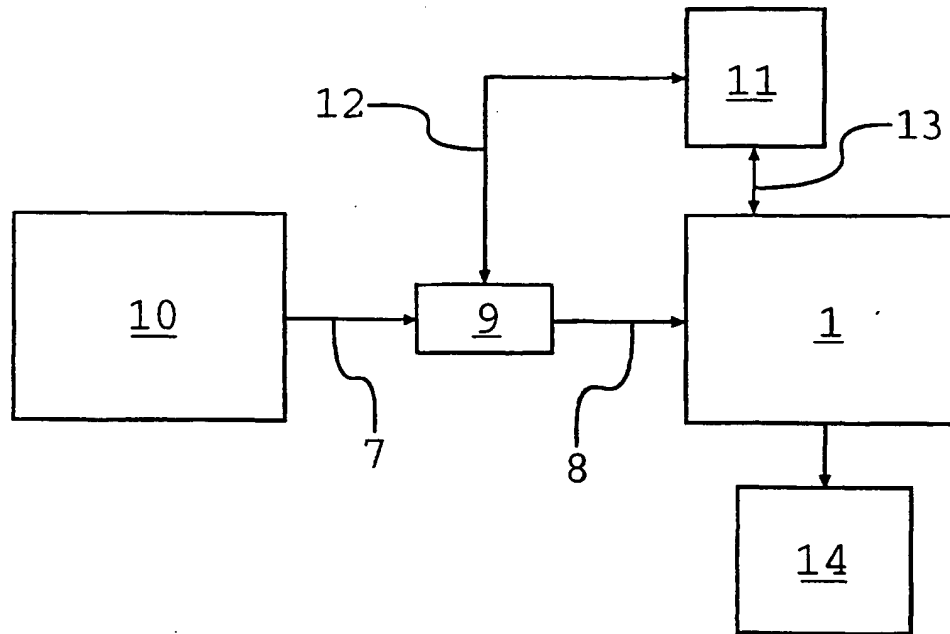
29. Rastermikroskop zur Anwendung des Verfahrens zur Intensitätsregelung nach einem der Ansprüche 1 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass Fluoreszenzobjekte mit einem Mehr-Photonen-Anregungsprozess anregbar sind.

---

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

---

- Leerseite -



**Fig. 1**

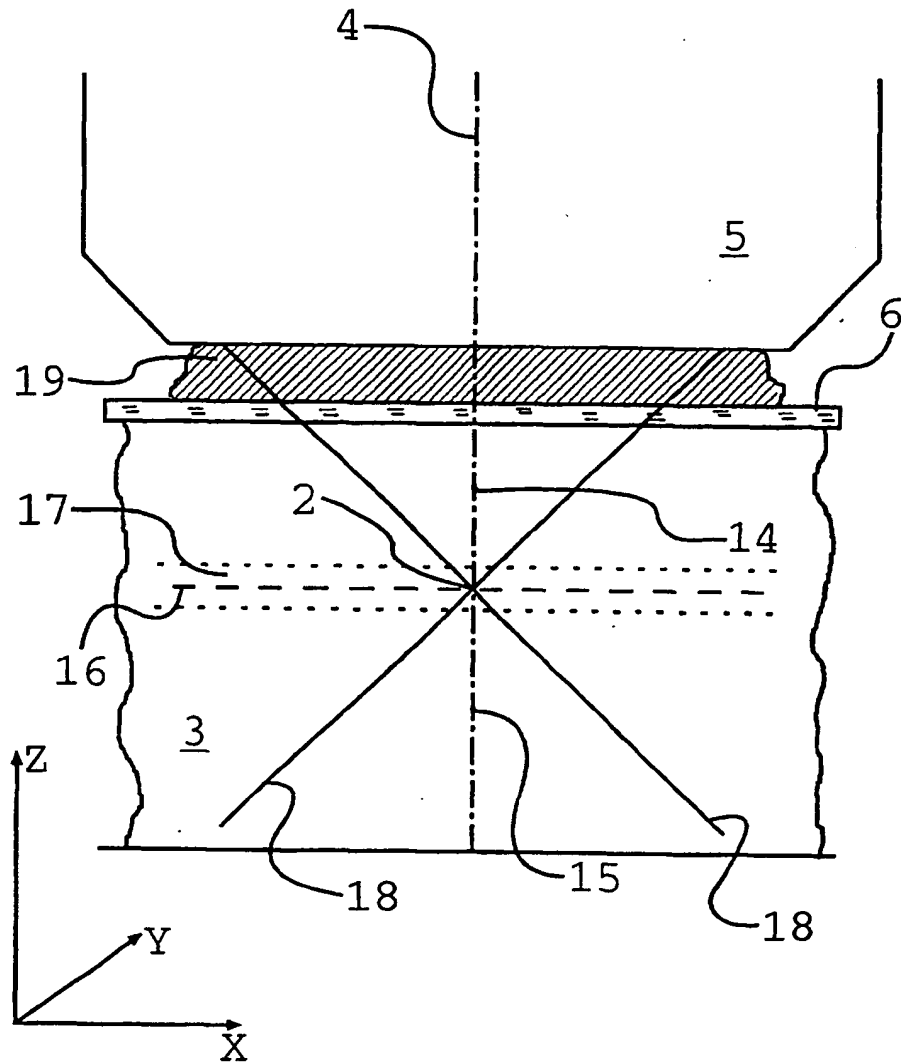


Fig. 2